·论　著·

分枝杆菌实验室诊断方法比较

刘　畅[1,2]，徐英春[2]，宋红梅[2]，杨文航[2]，杨启文[2]，刘亚丽[2]，郭莉娜[2]，刘文静[2]，赵　颖[2]，窦红涛[2]，王　瑶[2]，王　贺[2]，赵玉沛[3]，孙宏莉[2]

[1] 中国医学科学院 北京协和医学院研究生院，北京 100005
中国医学科学院　北京协和医学院　北京协和医院 [2] 检验科 [3] 基本外科，北京 100730

通信作者：孙宏莉　电话：010-69159763，E-mail：sunhl2010@ sina.com
赵玉沛　电话：010-69156014，E-mail：zhao8028@ 263.net

【摘要】**目的**　了解分枝杆菌实验室检测中培养、涂片抗酸染色及 PCR-荧光探针法的应用情况与诊断价值。**方法**　回顾 2013 年 1 月至 2015 年 12 月北京协和医院送检分枝杆菌的 10 326 份培养、25 269 份涂片抗酸染色及 5949 份 PCR-荧光探针法检测的标本种类分布及阳性标本检出率，比较 3 种检测方法的差异及诊断价值。**结果**　培养法以血液标本数量最多（31.4%），涂片抗酸染色和 PCR-荧光探针法均以痰标本数量最多（40.3%和 40.4%）。PCR-荧光探针法阳性标本检出率（8.9%）明显高于培养（5.6%）和涂片抗酸染色（1.9%）（$P<0.05$）。以培养法为金标准，PCR-荧光探针法的敏感性（42.9%）高于涂片抗酸染色法（31.3%），特异性（95.2%）低于涂片抗酸染色法（97.4%）（P 均<0.05）。**结论**　3 种分枝杆菌实验室检测方法中，PCR-荧光探针法的阳性标本检出率和敏感性均较高，在实验室分枝杆菌属的检测中具有重要价值。

【关键词】分枝杆菌属；培养；涂片抗酸染色；PCR-荧光探针法
【中图分类号】R521　　【文献标志码】A

Comparison of the Laboratory Diagnostic Methods of *Mycobacterium Spp*

LIU Chang[1,2], XU Ying-chun[2], SONG Hong-mei[2], YANG Wen-hang[2], YANG Qi-wen[2], LIU Ya-li[2], GUO Li-na[2], LIU Wen-jing[2], ZHAO Ying[2], DOU Hong-tao[2], WANG Yao[2], WANG He[2], ZHAO Yu-pei[3], SUN Hong-li[2]

[1]Graduate School, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China
[2]Department of Clinical Laboratory, [3]Department of General Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Corresponding authors: SUN Hong-li　Tel: 010-69159763, E-mail: sunhl2010@ sina.com
ZHAO Yu-pei　Tel: 010-69156014, E-mail: zhao8028@ 263.net

【**Abstract**】**Objective**　To evaluate and compare the clinical values of *Mycobacterium Spp* culture, anti-acid staining and Real-time FQ-PCR assay in the detection of *Mycobacterium Spp* infection. **Methods**　From January 2013 to December 2015, 10 326 specimens of *Mycobacterium Spp* culture, 25 269 specimens of anti-acid staining and 5949 specimens of Real-time FQ-PCR assay from Peking Union Medical College Hospital were analyzed from the perspectives of specimen distribution and positive isolation rates to compare the difference of these three methods and assess their diagnostic values. **Results**　From 2013 to 2015, among the methods of detecting

基金项目：公益性行业科研专项（201402001）

Mycobacterium Spp, the main *Mycobacterium Spp* culture of smear samples were blood specimens (31.4%), while that of anti-acid staining and Real-time FQ-PCR were sputum specimens (40.3% and 40.4%). *Mycobacterium Spp* isolation rate of Real-time FQ-PCR (8.9%) was significantly higher than those of culture (5.6%) and anti-acid staining (1.9%) (both $P<0.05$). Using culture as the gold standard, the sensitivity of Real-time FQ-PCR assay (42.9%) was higher than that of anti-acid staining (31.3%), but the specificity (95.2%) of Real-time FQ-PCR assay was lower than that of anti-acid staining (97.4%) ($P<0.05$). **Conclusions** Among the three laboratory diagnostic methods of *Mycobacterium Spp*, the Real-time FQ-PCR has the advantage of high isolation rate and high sensitivity. It is one of the effective methods for the detection of *Mycobacterium Spp*.

【**Key words**】*Mycobacterium Spp*; culture; anti-acid staining; Real-time FQ-PCR

传统分枝杆菌实验室诊断方法主要为分枝杆菌培养和涂片抗酸染色，近年来随着分子生物学技术的发展，荧光PCR技术已广泛应用于分枝杆菌的检测。如何快速合理地检测分枝杆菌成为实验室检测的主要问题。本研究对北京协和医院连续3年分枝杆菌实验室检测情况进行回顾性分析，探讨比较3种方法在医院中的应用价值，为临床医生快速送检提供参考。

1 材料和方法

1.1 标本来源

回顾性分析2013年1月至2015年12月北京协和医院实验室分枝杆菌检测数据，剔除同种标本类型的重复送检标本，多次送检结果一次阳性即视为阳性。共10 326份培养、25 269份涂片抗酸染色、5949份PCR-荧光探针法检测标本纳入本研究，主要包括外周血、呼吸道标本、无菌体液、组织标本等类型。

1.2 实验室检测方法

1.2.1 分枝杆菌培养

分枝杆菌罗氏培养：液化标本加无菌磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS）至约45ml，离心15 min，倒掉上清液，添加1~3 ml PBS以中和PH至6.8，取0.5 ml接种至罗氏培养管，35℃孵育，前2周每周观察2次，以后每周观察1次。

全自动分枝杆菌培养：按照MGIT 960全自动分枝杆菌液基培养检测系统（BD，美国）规定进行[1]。

1.2.2 涂片抗酸染色

涂片抗酸染色采用金胺（O）染色初筛，对可疑阳性标本进行萋尼染色［2种染液均购自珠海贝索（BASO）生物技术有限公司］，染色后镜检确认。

1.2.3 PCR-荧光探针法

试剂盒购自博奥生物有限公司。标本液化处理后使用核酸提取仪（Extractor 36）进行DNA提取，PCR扩增仪（RT-cycler™236基因扩增仪）扩增，条件设置：37℃ 300 s，94℃ 180 s，94℃ 15 s，60℃ 30 s，40个循环，50℃ 10 s。Ct值<40为阳性[2]。

1.3 观察指标

分析3年间培养、涂片抗酸染色和PCR-荧光探针法的呼吸道、无菌体液、组织等标本的送检量和阳性标本检出率；以分枝杆菌培养结果为金标准，计算涂片抗酸染色法和PCR-荧光探针法的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值及准确性。

1.4 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析，3年间阳性标本检出率比较采用卡方检验。涂片抗酸染色法和PCR-荧光探针法的诊断价值比较采用配对McNemar卡方检验，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 分枝杆菌培养送检标本种类、数量及检出率

2013至2015年全院分枝杆菌培养送检标本数量呈逐年上升趋势。其中MGIT 960全自动分枝杆菌液基培养检测标本8863份，罗氏培养标本1463份。标本种类以血液标本和呼吸道标本中的痰标本较多，分别占总标本量的31.4%（3244/10 326）和24.1%（2491/10 326），其次为无菌体液（胸水、尿液、脑脊液和腹水）和组织标本（淋巴结活检和肺组织）。不同标本类型分枝杆菌检出率有所不同，其中呼吸道标本中的气管支气管吸取物（10.1%）和痰（9.8%）检出率较高，其次为胸水（6.6%）和腹水（6.8%）。各年度送检标本总体分枝杆菌检出率相近（5.5%~5.7%），其中淋巴结活检和肺活检标本检出率有所升高，其他标本的检出率无明显变化。3年间总标本检出率差异无统计学意义（$P>0.05$）（表1）。

表 1 2013—2015 年分枝杆菌培养送检标本种类、数量及检出率

标本种类	总标本数[检出率(%)]	年度标本数[检出率(%)]		
		2013 年	2014 年	2015 年
外周血	3244(1.2)	894(1.2)	984(2.2)	1366(0.5)
呼吸道标本				
痰	2491(9.8)	712(8.0)	761(9.5)	1018(11.2)
气管支气管吸取物	1580(10.1)	423(12.5)	494(8.3)	663(9.8)
支气管肺泡灌洗液	392(5.9)	119(3.4)	162(6.8)	111(7.2)
无菌体液				
尿	389(6.2)	115(5.2)	134(7.5)	140(5.7)
胸水	288(6.6)	92(4.3)	100(5.0)	96(10.4)
腹水	220(6.8)	50(8.0)	85(4.7)	85(8.2)
脑脊液	220(1.8)	82(3.7)	61(1.6)	77(0)
组织标本				
淋巴结活检	257(4.3)	68(0)	90(3.3)	99(8.1)
肺活检	85(2.4)	26(0)	18(0)	41(4.9)
其他	1160(3.2)	314(5.6)	324(3.4)	522(2.2)
总计	10 326(5.6)	2895(5.5)	3213(5.6)	4218(5.7)

2.2 涂片抗酸染色送检标本种类、数量及检出率

分枝杆菌涂片抗酸染色送检标本数亦呈逐年上升趋势，标本数量为培养的 2.4 倍。以痰标本最多，占总标本量的 40.3%（10 196/25 269），其次为毛刷，占 14.9%（3754/25 269）。阳性标本以呼吸道标本（痰、毛刷、气管支气管吸取物和支气管肺泡灌洗液）为主，其中气管支气管吸取物检出率较高，为 3.8%。无菌体液中菌量相对较少，造成检出困难，检出率低，胸水和腹水 3 年检出率均为 0。分泌物（16.9%）和脓液（11.2%）的检出率最高。3 年间总标本检出率差异无统计学意义（P>0.05）（表 2）。

2.3 PCR-荧光探针法送检标本种类、数量及检出率

PCR-荧光探针法检测结核/非结核分枝杆菌核酸是 2013 年本院检验科新开展的项目，3 年间送检结核/非结核分枝杆菌核酸标本数为 5949 份，其中 405 份标本分离出结核分枝杆菌，124 份标本分离出非结核分枝杆菌。标本数量以痰和气管支气管吸取物最多，分别占总标本数量的 40.4%（2403/5949）和 22.8%（1359/5949）。标本种类以呼吸道标本（痰、气管支气管吸取物和支气管肺泡灌洗液）为主，其次为无菌体液（胸水、尿液、脑脊液和腹水）。阳性标本检出率以脓液最高（20.6%），其次为呼吸道标本中的气管支气管吸取物（12.3%）和淋巴结活检（11.2%）。3 年间总标本检出率差异具有统计学意义（P<0.05）（表 3）。

表 2 2013—2015 年分枝杆菌抗酸染色送检标本种类、数量及检出率

标本种类	总标本数[检出率(%)]	年度标本数[检出率(%)]		
		2013 年	2014 年	2015 年
呼吸道标本				
痰	10 196(2.6)	2825(2.9)	3444(2.3)	3927(2.6)
毛刷	3754(1.3)	1184(1.7)	1109(1.2)	1461(1.0)
气管支气管吸取物	1318(3.8)	200(8.5)	191(6.3)	927(2.2)
支气管肺泡灌洗液	716(1.5)	139(0.7)	161(0.6)	416(2.2)
便	1099(1.0)	282(1.4)	332(1.2)	485(0.6)
无菌体液				
脑脊液	3313(0.3)	873(0.5)	1120(0.2)	1320(0.3)
尿	1163(1.0)	312(0.6)	440(0.9)	411(1.5)
胸水	1001(0)	296(0)	282(0)	423(0)
腹水	599(0)	160(0)	209(0)	230(0)
组织标本				
淋巴结活检	303(4.0)	67(3.0)	91(3.3)	145(4.8)
肺活检	209(6.7)	51(7.8)	51(5.9)	107(6.5)
其他组织	110(8.2)	21(19.0)	32(0)	57(8.8)
皮肤组织	63(3.2)	20(0)	11(0)	32(6.3)
分泌物	150(16.9)	40(12.5)	42(18.2)	68(18.6)
脓液	152(11.2)	30(6.7)	57(14.0)	65(10.8)
其他	1123(4.2)	326(4.7)	297(5.1)	500(3.4)
总计	25 269(1.9)	6826(2.2)	7869(1.8)	10 574(1.9)

表 3 2013—2015 年分枝杆菌 PCR-荧光探针法送检标本种类、数量及检出率

标本种类	总标本数[检出率(%)]	年度标本数[检出率(%)]		
		2013 年	2014 年	2015 年
呼吸道标本				
痰	2403(7.9)	487(9.2)	806(7.9)	1110(7.3)
气管支气管吸取物	1359(12.3)	170(14.1)	563(15.2)	626(9.2)
支气管肺泡灌洗液	641(8.2)	98(10.2)	262(9.9)	281(6.4)
无菌体液				
脑脊液	365(5.5)	64(4.7)	123(6.6)	178(5.0)
胸水	343(2.6)	71(5.6)	119(3.4)	153(0.7)
尿	242(8.2)	44(0)	93(11.8)	105(8.6)
腹水	138(4.3)	22(4.5)	64(6.3)	52(1.9)
淋巴结活检	98(11.2)	5(0)	48(14.6)	45(8.9)
脓液	87(20.6)	22(18.2)	29(17.2)	36(25.0)
其他	273(12.5)	26(11.5)	126(10.4)	121(14.1)
总计	5949(8.9)	1009(9.3)	2233(10.2)	2707(7.7)

2013 至 2015 年，PCR-荧光探针法阳性标本总检出率（8.9%）明显高于培养（5.6%）和涂片抗酸染色（1.9%）（*P*<0.05）。

2.4 实验室分枝杆菌检测方法诊断价值比较

以培养结果为金标准，对所有同时采用培养、涂片抗酸染色和 PCR-荧光探针法检测的 3349 份标本的检测结果进行分析。涂片抗酸染色的敏感性较低，在 26.6%~40.3%之间波动，特异性、阴性预测值和阳性预测值无明显变化。3 年内 250 份涂片抗酸染色阴性标本培养出了分枝杆菌，随着标本量的上升，涂片抗酸染色阴性但培养阳性的标本量也逐年上升（表 4）。

2013 至 2015 年 3 年总体数据显示，PCR-荧光探针法的敏感性为 40.3%~44.4%，特异性为 92.8%~96.6%（表 5）。

比较涂片抗酸染色及 PCR-荧光探针法检测的实验室诊断价值，PCR-荧光探针法的敏感性高于涂片抗酸染色（42.9%比 31.3%，*P*<0.05），特异性低于涂片抗酸染色（95.2%比 97.4%，*P*<0.05），阳性预测值、阴性预测值和准确性差异均无统计学意义。

3 讨论

目前，分枝杆菌检测实验室方法包括分枝杆菌培养、涂片抗酸染色和 PCR-荧光探针法。涂片抗酸染色用金胺（O）染色初筛，对可疑阳性标本进行萋尼染色确诊。涂片抗酸染色操作简便快速，成本低，但敏感性低，含菌量达 10^4 才能检出。显微镜观察要求检验人员具备一定的经验，且由于人工操作及取样的不确定性，存在一定漏诊率。一般临床要求痰标本连续送检 3 次以提高涂片检出率[3]。分枝杆菌培养包括改良罗氏培养和液体培养（如 BD MGIT 960 液基培养）。改良罗氏培养需要 4~6 周，时间较长且需定期观察，不利于患者的管理和治疗[4]。目前，BD MGIT 960 液基培养是国内外公认的新的分枝杆菌实验室诊断“金标准”，8~14 d 可获知结果，是一种更加标准化的技术[5-7]。PCR-荧光探针技术因其简单快速、全封闭扩增、重复性好等优点并通过特异性引物和探针技术保障了实验的准确性，2.5 h 即可完成一个反应，对于阳性结果可区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌，补充了细菌学检测的不足，其缺点是结果易受环境污染而呈假阳性，且不能判断标本中是否为活菌[2]。

本研究分析比较了北京协和医院 2013 至 2015 年间 3 种分枝杆菌检测方法，临床分枝杆菌实验室检测的标本送检量逐年上升。涂片抗酸染色送检标本数量最多，为培养的 2.4 倍，但其阳性标本检出率较低，仅为 1.9%，且 3 年间检出率无明显变化。以培养为金标准，涂片抗酸染色敏感性较低（31.3%），即漏检标本较多；特异性较高为 97.4%，高于 PCR-荧光探

表 4 2013—2015 年涂片抗酸染色法检测分枝杆菌的评价指标比较

涂片抗酸染色法/年度	培养 +	培养 −	敏感性（%）	特异性（%）	阳性预测值（%）	阴性预测值（%）	准确性（约登指数）
2013							
+	25	23	40.3	95.2	52.1	92.6	0.355
−	37	460					
2014							
+	33	31	26.6	97.2	51.6	92.2	0.238
−	91	1080					
2015							
+	56	23	31.5	98.3	70.9	91.8	0.298
−	122	1368					
总计							
+	114	77	31.3	97.4	59.7	92.1	0.287
−	250	2908					

表 5 2013—2015 年 PCR-荧光探针法检测分枝杆菌评价指标比较

PCR-荧光探针法/年度	培养 +	培养 −	敏感性（%）	特异性（%）	阳性预测值（%）	阴性预测值（%）	准确性（约登指数）
2013							
+	25	35	40.3	92.8	41.7	92.4	0.331
−	37	448					
2014							
+	55	61	44.4	94.5	47.4	93.8	0.389
−	69	1050					
2015							
+	76	47	42.7	96.6	61.8	92.9	0.393
−	102	1344					
总计							
+	156	143	42.9	95.2	52.2	93.2	0.381
−	208	2842					

针法的 95.2%（$P<0.05$）。PCR-荧光探针法分枝杆菌总检出率（8.9%）高于涂片抗酸染色（1.9%）和培养（5.6%），差异具有统计学意义（P 均<0.05）。2015 年 PCR-荧光探针法阳性标本检出率略有下降，可能原因为送检 PCR-荧光探针法的标本总量增多，而阳性标本数并未增加，其敏感性为 42.9%，高于涂片法 31.3%（$P<0.05$）。

涂片抗酸染色和 PCR-荧光探针法检测的阳性预测值均较低，分别为 59.7%和 52.2%，推测阳性预测值低可能原因有标本污染或标本中细菌繁殖导致假阳性或作为“金标准”的培养法敏感性较低[8]，此时应结合临床症状进行判断。

分枝杆菌培养为实验室诊断的“金标准”，但检测周期长。涂片抗酸染色简便快捷，但阳性样本检出率和敏感性低。PCR-荧光探针检测作为新型的分子检测技术，与培养相比检测周期明显缩短，与涂片抗酸染色相比，具有较高的检测敏感性，对于阳性结果可区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌，直接诊断结核病，在实验室分枝杆菌属的检测中具有重要价值[9-10]。

本研究的局限性：（1）本文为回顾性研究，可能存在一定的信息偏倚。（2）在培养数据分析时，本文将罗氏培养与 MGIT 960 全自动分枝杆菌液基培养数合在一起进行分析，且 MGIT 960 全自动分枝杆菌液基培养所占比例逐年上升，可能会存在混杂偏倚，对结果的判断产生影响。（3）本研究仅对实验室检测方法进行了对比分析，未结合临床诊断信息，未能对比实验室和临床诊断的差异性。

参 考 文 献

［1］ 张涛，吕纯芳，卢留珠，等. BACTEC MGIT960 系统快速培养分枝杆菌的效果评价［J］. 临床肺科杂志，2011，16：717-718.

［2］ 郭莉娜，徐英春，孙宏莉，等. PCR-荧光探针法快速诊断分枝杆菌属感染临床应用研究［J］. 中华医院感染学杂志，2015，25：4811-4813.

［3］ 刘家云，郝晓柯. 结核病实验室诊断方法新进展［J］. 临床检验杂志，2013，31：115-117.

［4］ 陈建波，黄同花，陈郁筠，等. 结核病 3 种实验诊断方法比较与分枝杆菌耐药性分析［J］. 国际检验医学杂志，2012，33：420-421.

［5］ Gallo JF，Jmw P，Saraceni CP，et al. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 system and the resazurin microtiter assay for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to second-line drugs［J］. J Microbiol Methods，2017，139：168-171.

［6］ Battaglioli T，Soto A，Agapito J，et al. Manual liquid culture on simple Middlebrook 7H9 or MGIT for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis［J］. Trop Med Int Health，2014，19：1500-1503.

［7］ Huang Z，Qin C，Du J，et al. Evaluation of the microscopic observation drug susceptibility assay for the rapid detection of MDR-TB and XDR-TB in China：a prospective multicentre study［J］. J Antimicrob Chemother，2015，70：456.

［8］ 张丽帆，边赛男，刘晓清，等. HIV 阴性结核分枝杆菌血流感染成年患者临床及实验室特征［J］. 协和医学杂志，2017，8：161-166.

［9］ Zhang Q，Zhou C. Comparison of laboratory testing methods for the diagnosis of tuberculous pleurisy in China［J］. Scientific Reports，2017，7：4549.

［10］ 黄丽美，林健雄，彭东东，等. 联合检测技术用于结核病及耐多药结核病快速诊断的研究［J］. 中国病原生物学杂志，2015，7：638-641.

（收稿日期：2016-08-29）